

30.07.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 16 SEP 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 8月 1日

出願番号  
Application Number: 特願2003-285422

[ST. 10/C]: [JP2003-285422]

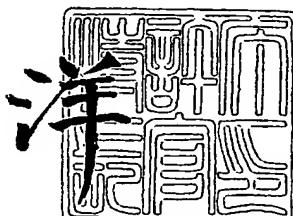
出願人  
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月 2日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3078848

【書類名】 特許願  
【整理番号】 339-03277  
【提出日】 平成15年 8月 1日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 9/00  
A61K 31/00

【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所  
つくばセンター内

【氏名】 山㟢 登

【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所  
つくばセンター内

【氏名】 大黒 伸行

【特許出願人】  
【識別番号】 301021533  
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代理人】  
【識別番号】 100091096  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】  
【識別番号】 100118773  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】  
【識別番号】 100111741  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 田中 夏夫

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】特許請求の範囲****【請求項1】**

糖鎖がリポソーム膜に結合されている糖鎖修飾リポソームを含む眼病治療用または診断用医薬組成物。

**【請求項2】**

リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類（モル比0～70%）、フォスファチジルエタノールアミン類（モル比0～30%）、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類（モル比0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類（モル比0～40%）、およびコレステロール類（モル比0～70%）を含む、請求項1記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

**【請求項3】**

糖鎖の種類および密度が制御されて結合されている、請求項1または2記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

**【請求項4】**

リポソームの粒径が30～500nmである、請求項1から3のいずれか1項に記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

**【請求項5】**

リポソームの粒径が50～300nmである、請求項4記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

**【請求項6】**

リポソームの粒径が70～150nmである、請求項5記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

**【請求項7】**

リポソームのゼータ電位が-50～10mVである、請求項1から6のいずれか1項記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

**【請求項8】**

リポソームのゼータ電位が-40～0mVである、請求項7記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

**【請求項9】**

リポソームのゼータ電位が-30～-10mVである、請求項8記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

**【請求項10】**

リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リポソームに結合させるリンカー蛋白質1分子当たり1～60個である、請求項1から9のいずれか1項に記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

**【請求項11】**

リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リンカー蛋白質を用いる場合は、リポソーム1粒子当たり1～30000個であり、リンカー蛋白質を用いない場合は、リポソーム1粒子当たり最高1～500000個である、請求項1から9のいずれか1項に記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

**【請求項12】**

糖鎖がルイスX型三糖鎖、シアリルルイスX型四糖鎖、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖、アルファ1,2マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3マンノビオース二糖鎖、アルファ1,4マンノビオース二糖鎖、アルファ1,6マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース3五糖鎖、オリゴマンノース4b六糖鎖、オリゴマンノース5七糖鎖、オリゴマンノース6八糖鎖、オリゴマンノース7九糖鎖、オリゴマンノース8十糖鎖、オリゴマンノース9十一糖鎖、ラクトース二糖鎖、2'-フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖類、3-フコシルラクトース三糖鎖、3'-シアリルラクトース三糖鎖および6'-シアリルラクトース三糖鎖からなる群から選択される、請求項1から11のいずれか1項に記載の眼病治療用また

は診断用医薬組成物。

【請求項13】

糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されている、請求項1から12のいずれか1項に記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

【請求項14】

リンカー蛋白質がヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである請求項1から13のいずれか1項に記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

【請求項15】

リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項1から14のいずれか1項に記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

【請求項16】

リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にアミノアルコールを結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項15記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

【請求項17】

リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項16記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

【請求項18】

眼病が、ぶどう膜炎を含む内眼炎、糖尿病網膜症、血管新生黄斑症、アレルギー性結膜炎、眼窩および眼内腫瘍、視神経炎、後部強膜炎を含む強膜炎からなる群から選択される請求項1から17のいずれか1項に記載の眼病治療用または診断用医薬組成物。

【請求項19】

糖鎖修飾リポソームが含む薬剤が、副腎皮質ホルモン、抗炎症薬、免疫抑制剤、抗がん剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNAやDNAなどの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子からなる群から選択される請求項1から18のいずれか1項に記載の眼病治療用医薬組成物。

【書類名】明細書

【発明の名称】標的指向性リポソームを含む眼病治療または診断薬

【技術分野】

**【0001】**

本発明は、眼炎症性疾患等の眼病に対するドラッグデリバリーシステムに関する。

【背景技術】

**【0002】**

米国の国家ナノテク戦略（N N I）によって実現を目指す具体的目標の一例として、「癌細胞や標的組織を狙い撃ちする薬物や遺伝子送達システム（D D S：ドラッグデリバリーシステム）」を掲げた。日本の総合科学技術会議のナノテクノロジー・材料分野推進戦略でも、重点領域として「医療用極小システム・材料、生物のメカニズムを活用し制御するナノバイオロジー」があり、その5年間の研究開発目標の1つとして「健康寿命延伸のための生体機能材料・ピンポイント治療等技術の基本シーズ確立」が掲げられている。一方、高齢化社会となるに伴い癌の発症率・死亡率は年々増えており、新規な治療材料である標的指向D D Sの開発が待望されている。その他の病気においても副作用のない標的指向D D Sナノ材料の重要性が注目されており、その市場規模は近い将来に10兆円を超えると予測されている。また、これらの材料は治療とともに診断への利用においても期待されている。

**【0003】**

医薬品の治療効果は、薬物が特定の標的部位に到達し、そこで作用することにより発現される。その一方で、医薬品による副作用とは、薬物が不必要的部位に作用してしまうことである。従って、薬物を有効かつ安全に使用するためにもドラッグデリバリーシステムの開発が求められている。その中でも特に標的指向（ターゲティング）D D Sとは、薬物を「体内の必要な部位に」、「必要な量を」、「必要な時間だけ」送り込むといった概念である。そのための代表的な材料としての微粒子性キャリアーであるリポソームが注目されている。この粒子に標的指向機能をもたせるために、リポソームの脂質の種類、組成比、粒子径、表面電荷を変化させるなどの受動的ターゲティング法が試みられているが、いまだ本法は不十分であり更なる改良が求められている。

**【0004】**

一方、高機能のターゲティングを可能にするために、能動的ターゲティング法も試みられている。これは”ミサイルドラッグ”ともよばれ理想的なターゲティング法であるが、国内外においていまだ完成されたものはなく今後の発展が大いに期待されているものである。本法は、リポソーム膜面上にリガンドを結合させ、標的組織の細胞膜面上に存在するレセプターに特異的に認識されることによって、積極的にターゲティングを可能にさせる方法である。この能動的ターゲティング法での標的となる細胞膜面上に存在するレセプターのリガンドとしては、抗原、抗体、ペプチド、糖脂質や糖蛋白質などが考えられる。これらのうち、糖脂質や糖蛋白質の糖鎖は、生体組織の発生や形態形成、細胞の増殖や分化、生体防御や受精機構、癌化とその転移機構などの様々な細胞間コミュニケーションにおいて情報分子としての重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。

**【0005】**

また、その標的となる各組織の細胞膜面上に存在するレセプターとしてのセレクチン、DC-SIGN、DC-SGNR、コレクチン、マンノース結合レクチン等のC-タイプレクチン、シグレック等のI-タイプレクチン、マンノース-6-リン酸受容体などのP-タイプレクチン、R-タイプレクチン、L-タイプレクチン、M-タイプレクチン、ガレクチンなどの各種のレクチン（糖鎖認識蛋白質）についての研究も進んできたことから、各種の分子構造を有する糖鎖は新しいD D Sリガンドとして注目されてきている (1) Yamazaki, N., Kojima, S., Bovin, N.V., Andre, S., Gabius, S. and Gabius, H.-J. (2000) Adv. Drug Delivery Rev. 43, 225-244. 2) Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) Trends in Glycoscience and Glycotechnology 13, 319-329. <http://www.gak.co.jp/TIGG/71PDF/yamazaki.pdf>) 。

## 【0006】

外膜表面にリガンドを結合したリポソームについては、癌などの標的部位に選択的に薬物や遺伝子などを送達するためのDDS材料として多くの研究がなされてきた。しかしながら、それらは、生体外では標的細胞に結合するが、生体内では期待される標的細胞や組織にターゲティングされないものがほとんどである (1)Forssen, E. and Willis, M. (1998) *Adv. Drug Delivery Rev.* 29, 249-271. 2)高橋俊雄・橋田充編(1999)、今日のDDS・薬物送達システム、159-167頁、医薬ジャーナル社、大阪)。糖鎖の分子認識機能を利用したDDS材料の研究開発においても、糖鎖を有する糖脂質を導入したリポソームについて若干の研究が知られているが、それらの機能評価は生体外 (*in vitro*) によるもののみであり、糖鎖を有する糖蛋白質を導入したリポソームの研究はほとんど進んでいない (1)DeFrees, S.A., Phillips, L., Guo, L. and Zalipsky, S. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 6101-6104. 2)Spevak, W., Foxall, C., Charych, D.H., Dasgupta, F. and Nagy, J.O. (1996) *J. Med. Chem.* 39, 1018-1020. 3)Stahn, R., Schafer, H., Kernchen, F. and Schreiber, J. (1998) *Glycobiology* 8, 311-319. 4)Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 13, 319-329. <http://www.gak.co.jp/TIGG/71PDF/yamazaki.pdf>)。したがって、糖脂質や糖蛋白質の多種多様な糖鎖を結合したリポソームについての調製法と生体内動態 (*in vivo*) 解析を含めた体系的な研究は、これまで未開発で今後の進展が期待される重要な課題である。

## 【0007】

さらに新しいタイプのDDS材料研究として、投与が最も簡便・安価に行える経口投与で使用可能なDDS材料開発も重要な課題である。たとえば、ペプチド性および蛋白質性医薬品などは一般的に水溶性で高分子量であり消化管の小腸粘膜透過性が低いため酵素分解を受けるなどにより経口投与してもほとんど腸管吸収されない。そこでこれらの高分子量の医薬品や遺伝子などを腸管から血液中へ送達するためのDDS材料としてリガンド結合リポソームの研究が注目されつつある (Lehr, C.-M. (2000) *J. Controlled Release* 65, 19-29)。しかしながら、これらのリガンドとして糖鎖を用いた腸管吸収制御性リポソームの研究は未だ報告されていない。

## 【0008】

本発明者等は、既に、糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されており、糖鎖が、ルイスX型三糖鎖、シアリルルイスX型四糖鎖、3' -シアリルラクトサミン三糖鎖、6' -シアリルラクトサミン三糖鎖から選ばれたものであり、リポソーム膜および/またはリンカー蛋白質にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン等の低分子親水化合物が任意に結合しており親水性化されていることを特徴とする糖鎖修飾リポソームおよびラクトース2糖鎖、2' -フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖類および3-フコシルラクトース三糖鎖から選ばれた糖鎖により修飾されたリポソームであって、糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソームに結合していてもよい、腸管吸収性リポソームについて特許出願を行っている。

## 【0009】

しかし、眼炎症等の眼病に対して治療用または診断用薬剤を標的指向的に投薬するドラッグデリバリーシステムは開発されていなかった。

## 【0010】

【非特許文献1】Yamazaki, N., Kojima, S., Bovin, N.V., Andre, S., Gabius, S. and Gabius, H.-J. (2000) *Adv. Drug Delivery Rev.* 43, 225-244.

【非特許文献2】Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 13, 319-329.

【非特許文献3】Forssen, E. and Willis, M. (1998) *Adv. Drug Delivery Rev.* 29, 249-271.

【非特許文献4】高橋俊雄・橋田充編(1999)、今日のDDS・薬物送達システム、159-167頁、医薬ジャーナル社

【非特許文献5】 DeFrees, S.A., Phillips, L., Guo, L. and Zalipsky, S. (1996) J. Am. Chem. Soc. 118, 6101-6104.

【非特許文献6】 Spevak, W., Foxall, C., Charych, D.H., Dasgupta, F. and Nagy, J.O. (1996) J. Med. Chem. 39, 1018-1020.

【非特許文献7】 Stahn, R., Schafer, H., Kernchen, F. and Schreiber, J. (1998) Glycobiology 8, 311-319.

【非特許文献8】 Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) Trends in Glycoscience and Glycotechnology 13, 319-329.

【非特許文献9】 Lehr, C.-M. (2000) J. Controlled Release 65, 19-29

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

眼炎症部位等の標的組織に集積し、局所的に薬剤や遺伝子を患部に送り込むための治療または診断用のドラッグデリバリーシステム(DDS)として利用できる標的指向性DDSナノ粒子の提供。具体的には、眼炎症部位の血管内皮細胞に発現するE-セレクチン、P-セレクチン等と結合しうる糖鎖を表面に結合させたドラッグデリバリー用の標的指向性リポソームの提供。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、先に表面に特定の糖鎖が結合したDDS用標的指向性リポソームを開発した。該標的指向性リポソームには、シリルルイスX糖鎖(sLeX)が結合しており、腫瘍部位、炎症部位への移行性において高い効率を有していた。

【0013】

本発明者らは、この標的指向性リポソームの眼科領域への応用について鋭意検討を行い、眼炎症モデルマウスを作出し、上記標的指向性リポソームが眼の炎症部位に指向的に取り込まれることを見出し本発明を完成させるに至った。

【0014】

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 糖鎖がリポソーム膜に結合されている糖鎖修飾リポソームを含む眼病治療用または診断用医薬組成物、

[2] リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類(モル比0~70%)、フォスファチジルエタノールアミン類(モル比0~30%)、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩(モル比0~30%)、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類(モル比0~40%)、およびコレステロール類(モル比0~70%)を含む、[1]の眼病治療用または診断用医薬組成物、

[3] 糖鎖の種類および密度が制御されて結合されている、[1]または[2]の眼病治療用または診断用医薬組成物、

[4] リポソームの粒径が30~500nmである、[1]から[3]のいずれかの眼病治療用または診断用医薬組成物、

[5] リポソームの粒径が50~300nmである、[4]の眼病治療用または診断用医薬組成物、

[6] リポソームの粒径が70~150nmである、[5]の眼病治療用または診断用医薬組成物、

[7] リポソームのゼータ電位が-50~-10mVである、[1]から[6]のいずれかの眼病治療用または診断用医薬組成物、

[8] リポソームのゼータ電位が-40~-0mVである、[7]の眼病治療用または診断用医薬組成物、

[9] リポソームのゼータ電位が-30~-10mVである、[8]の眼病治療用または診断用医薬組成物、

[10] リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リポソームに結合させるリンカー蛋白

質1分子当り1～60個である、[1]から[9]のいずれかの眼病治療用または診断用医薬組成物、

[11] リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リンカー蛋白質を用いる場合は、リポソーム1粒子当り1～30000個であり、リンカー蛋白質を用いない場合は、リポソーム1粒子当り最高1～500000個である、[1]から[9]のいずれかの眼病治療用または診断用医薬組成物、

[12] 糖鎖がルイスX型三糖鎖、シリアルルイスX型四糖鎖、3'-シリアルラクトサミン三糖鎖、6'-シリアルラクトサミン三糖鎖、アルファ1,2マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3マンノビオース二糖鎖、アルファ1,4マンノビオース二糖鎖、アルファ1,6マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース3五糖鎖、オリゴマンノース4b六糖鎖、オリゴマンノース5七糖鎖、オリゴマンノース6八糖鎖、オリゴマンノース7九糖鎖、オリゴマンノース8十糖鎖、オリゴマンノース9十一糖鎖、ラクトース二糖鎖、2'-フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖類、3-フコシルラクトース三糖鎖、3'-シリアルラクトース三糖鎖および6'-シリアルラクトース三糖鎖からなる群から選択される、[1]から[11]のいずれかの眼病治療用または診断用医薬組成物、

[13] 糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されている、[1]から[12]のいずれかの眼病治療用または診断用医薬組成物、

[13] リンカー蛋白質がヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである[1]から[12]のいずれかの眼病治療用または診断用医薬組成物、

[14] リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、[1]から[13]のいずれかの眼病治療用または診断用医薬組成物、

[15] リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にアミノアルコールを結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、[14]の眼病治療用または診断用医薬組成物、

[16] リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、[15]の眼病治療用または診断用医薬組成物、

[17] 眼病が、ぶどう膜炎を含む内眼炎、糖尿病網膜症、血管新生黄斑症、アレルギー性結膜炎、眼窩および眼内腫瘍、視神経炎、後部強膜炎を含む強膜炎からなる群から選択される[1]から[16]のいずれかの眼病治療用または診断用医薬組成物、ならびに

[18] 糖鎖修飾リポソームが含む薬剤が、副腎皮質ホルモン、抗炎症薬、免疫抑制剤、抗がん剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNAやDNAなどの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子からなる群から選択される[1]から[17]のいずれかの眼病治療用医薬組成物。

#### 【発明の効果】

##### 【0015】

本発明の眼病治療用標的指向性リポソームは、眼炎症等の眼病部位に特異的に取り込まれ、リポソームに封入された眼病治療薬剤を放出する。本発明のリポソームは眼病に対するドラッグデリバリーシステムのための治療用または診断用薬剤としての効果を有する。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0016】

本発明は、眼炎症等の眼病の病巣部位に標的指向性を有し、病巣部位に特異的に取り込まれ、病巣部位で封入された薬剤を放出し、病巣を治療しうる標的指向性リポソームである。

##### 【0017】

炎症時に血管内皮細胞に発現するE-セレクチン、P-セレクチンと白血球の細胞膜上に発現している糖鎖であるシリアルルイスXが強く結合することが知られている。本リポソームはこのシリアルルイスX糖鎖またはこれと同様にE-セレクチン、P-セレクチン等に反

応することができる糖鎖が糖鎖の種類と密度が制御されて結合しているリポソームであり、血管内皮細胞がE-セレクチン、P-セレクチン等を発現している病巣部位に特異的に集積すると考えられる。またE-セレクチン、P-セレクチン等を発現している部位は炎症や血管新生が生じている部位であり、そのような部位の血管は内皮細胞の細胞間隙が拡大しており、集積したリポソームがその隙間から病巣部位およびその周囲に拡散するものと考えられる。拡散したリポソームは病巣部位およびその周囲の各種細胞に取り込まれ(phagocytosis)、細胞内で内包している薬剤を放出する。このようなメカニズムで眼疾患に効果を発揮する。

### 【0018】

本発明のリポソームに結合させる糖鎖として、上述のようにE-セレクチン、P-セレクチン等に反応することができる糖鎖が挙げられる。ここで、E-セレクチン、P-セレクチン等とは、セレクチン、DC-SIGN、DC-SGNR、コレクチン、マンノース結合レクチン等のC-タイプレクチン、シグレック等のIタイプレクチン、マンノース-6-リン酸受容体などのPタイプレクチン、Rタイプレクチン、Lタイプレクチン、Mタイプレクチン、ガレクチンなどの各種のレクチン(糖鎖認識蛋白質)をいう。このような糖鎖は限定されないが、例えば、ルイスX型三糖鎖(構造式を図1に示す。以下、同様)、シアリルルイスX型四糖鎖(図2)、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖(図3)、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖(図4)、アルファ1,2マンノビオース二糖鎖(図5)、アルファ1,3マンノビオース二糖鎖(図6)、アルファ1,4マンノビオース二糖鎖(図7)、アルファ1,6マンノビオース二糖鎖(図8)、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖(図9)、オリゴマンノース3五糖鎖(図10)、オリゴマンノース4b六糖鎖(図11)、オリゴマンノース5七糖鎖(図12)、オリゴマンノース6八糖鎖(図13)、オリゴマンノース7九糖鎖(図14)、オリゴマンノース8十糖鎖(図15)、オリゴマンノース9十一糖鎖(図16)、ラクトース二糖鎖(図17)、2'-フコシルラクトース三糖鎖(図18)、ジフコシルラクトース四糖類(図19)、3-フコシルラクトース三糖鎖(図20)、3'-シアリルラクトース三糖鎖(図21)および6'-シアリルラクトース三糖鎖(図22)が挙げられる。

### 【0019】

#### (1) 標的指向性リポソームの作製

リポソームとは、通常、膜状に集合した脂質層および内部の水層から構成される閉鎖小胞を意味する。本発明のリポソームは、図1～22に示されるように、その表面すなわち脂質層に糖鎖が、結合している、糖鎖は直接リポソームの脂質層に結合していてもよいし、ヒト血清アルブミンのようなリンカー蛋白質を介して、共有結合していてもよい。

### 【0020】

本発明のリポソームを構成する脂質としては、例えば、フォスファチジルコリン類、フォスファチジルエタノールアミン類、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類、コレステロール類等が挙げられ、フォスファチジルコリン類としては、ジミリストイルフォスファチジルコリン、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、ジステアロイルフォスファチジルコリン等が、また、フォスファチジルエタノールアミン類としては、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン等が、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類としては、ジミリストイルフォスファチジン酸、ジパルミトイルフォスファチジン酸、ジステアロイルフォスファチジン酸、ジセチルリン酸等が、ガングリオシド類としては、ガングリオシドGM1、ガングリオシドGD1a、ガングリオシドGT1b等が、糖脂質類としては、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、ラクトシルセラミド、フォスファチド、グロボシド等が、フォスファチジルグリセロール類としては、ジミリストイルフォスファチジルグリセロール、ジパルミトイルフォスファチジルグリセロール、ジステアロイルフォスファチジルグリセロール等が好ましい。このうち、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類、ガングリオシド類もしくは糖脂質類、コレステロール類はリポソームの安定性を上昇させる効果を有するので、構成脂質

として添加するのが望ましい。

【0021】

例えば、本発明のリポソームを構成する脂質として、フォスファチジルコリン類（モル比0～70%）、フォスファチジルエタノールアミン類（モル比0～30%）、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩（モル比0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類（モル比0～40%）、およびコレステロール類（モル比0～70%）を含むものが挙げられる。

【0022】

リポソーム自体は、周知の方法に従い製造することができるが、これには、薄膜法、逆層蒸発法、エタノール注入法、脱水一再水和法等を挙げることができる。

【0023】

また、超音波照射法、エクストルージョン法、フレンチプレス法、ホモジナイゼーション法等を用いて、リポソームの粒子径を調節することも可能である。本発明のリポソーム自体の製法について、具体的に述べると、例えば、まず、フォスファチジルコリン類、コレステロール、フォスファチジルエタノールアミン類、フォスファチジン酸類、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類を配合成分とする脂質と界面活性剤コール酸ナトリウムとの混合ミセルを調製する。

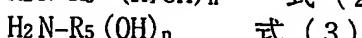
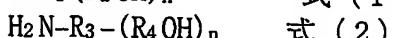
【0024】

とりわけ、フォスファチジルエタノールアミン類の配合は親水性化反応部位として、ガングリオシド類または糖脂質類またはフォスファチジルグリセロール類の配合はリンカーホテインの結合部位として必須のものである。そして、これにより得られる混合ミセルの限外濾過を行うことによりリポソームを作製する。

【0025】

本発明において使用するリポソームは、通常のものでも使用できるが、その表面は親水性化されていることが望ましい。上述のようにしてリポソームを作製した後にリポソーム表面を親水性化する。リポソーム表面の親水性化は、リポソーム表面に親水性化合物を結合させることにより行う。親水性化に用いる化合物としては、低分子の親水性化合物、好ましくは少なくとも1つのOH基を有する低分子の親水性化合物、さらに好ましくは、少なくとも2つのOH基を有する低分子の親水性化合物が挙げられる。このような親水性化合物として、例えば、トリス（ヒドロキシアルキル）アミノメタン等のアミノアルコール等が挙げられ、さらに具体的には、トリス（ヒドロキシメチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノプロパン等が挙げられる。例えば、リポソーム膜の脂質フォスファチジルエタノールアミン上に架橋用の2価試薬とトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンとを用いてリポソーム表面を親水性化する。親水性化合物の一般式は、下記式（1）、式（2）、式（3）等で示される。

【0026】



【0027】

ここで、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>は、直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、Xはリポソーム脂質と直接または架橋用の2価試薬と結合する反応性官能基を示し、例えば、COOH、NH、NH<sub>2</sub>、CHO等が挙げられる。nは自然数を示す。

【0028】

リポソームの親水性化は、従来公知の方法、例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、無水マレイン酸共重合体等を共有結合により結合させたリン脂質を用い

てリポソームを作成する方法（特開2000-302685号）等の方法を採用することによっても行うことができる。

#### 【0029】

このうち、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを用いてリポソーム表面を親水性化することが特に好ましい。

#### 【0030】

本発明のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等の低分子親水性化合物を用いる手法は、ポリエチレングリコールなどを用いる従来の親水性化方法と比較していくつかの点で好ましい。例えば、本発明のように糖鎖をリポソーム上に結合してその分子認識機能を標的指向性に利用するものでは、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等の低分子親水化合物は低分子量物質であるので従来のポリエチレングリコールなどの高分子量物質を用いる方法に比べて、糖鎖に対する立体障害となりにくく標的細胞膜面上のレクチン（糖鎖認識蛋白質）による糖鎖分子認識反応の進行を妨げないので特に好ましい。

#### 【0031】

また、本発明によるリポソームは該親水性化処理後においても粒径分布や成分組成、分散特性が良好であり、長時間の保存性や生体内安定性も優れているのでリポソーム製剤化して利用するためには好ましい。

#### 【0032】

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等の低分子親水性化合物を用いてリポソーム表面を親水性化するには、例えばジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン等の脂質を用いて、常法により得たリポソーム溶液にビススルフォスクシニミデルスペラート、ジスクシニミデルグルタレート、ジチオビススクシニミデルプロピオネート、ジスクシニミデルスペラート、3,3'-ジチオビススルフォスクシニミデルプロピオネート、エチレングリコールビススルフォスクシニミデルスクシネート、エチレングリコールビススルフォスクシニミデルスクシネート等の2価試薬を加えて反応させることにより、リポソーム膜上のジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン等の脂質に2価試薬を結合させ、次いでトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを、該2価試薬の一方の結合手と反応させることにより、リポソーム表面にトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを結合せしめる。

#### 【0033】

本発明においては、上記のようにして作製したリポソームに、上記の糖鎖のいずれかを直接結合させてもよいし、さらに、糖鎖をリンカー蛋白質を介して結合させてもよい。この際、リポソームに結合させる糖鎖の種類は1種類に限らず、複数の糖鎖を結合させてもよい。この場合の複数の糖鎖は同じ組織または器官の細胞表面に共通して存在する異なるレクチンに対して結合活性を有する複数の糖鎖であってもよいし、異なる組織または器官の細胞表面に存在する異なるレクチンに対して結合活性を有する糖鎖であってもよい。前者のような複数の糖鎖を選択することにより、特定の標的組織または器官を確実に指向することができ、後者のような複数の糖鎖を選択することにより、1種類のリポソームに複数の標的を指向させることができ、マルチパスな標的指向性リポソームを得ることができる。

#### 【0034】

なお、糖鎖をリポソームに結合させるには、リポソームの製造時にリンカー蛋白質および／または糖鎖を混合し、リポソームを製造させつつ糖鎖をその表面に結合させることも可能であるが、あらかじめリポソーム、リンカー蛋白質および糖鎖を別途準備し、製造が完了したリポソームにリンカー蛋白質および／または糖鎖を結合させたほうが望ましい。これは、リポソームにリンカー蛋白質および／または糖鎖を結合させることにより、結合させる糖鎖の密度を制御できるからである。

#### 【0035】

糖鎖のリポソームへの直接結合は、以下に述べるような方法で行うことができる。

糖鎖を糖脂質として混合してリポソームを製造するか、製造後のリポソームのリン脂質に糖鎖を結合するとともに糖鎖密度を制御する。

#### 【0036】

リンカー蛋白質を用いて糖鎖を結合させる場合、リンカー蛋白質としては、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、ウシ血清アルブミン（BSA）等の動物の血清アルブミンが挙げられるが、特にヒト血清アルブミンを使用する場合は、各組織に対する取り込みが多いことがマウスについての実験により確かめられている。

#### 【0037】

また、後述のように、本発明の標的指向性リポソームを医薬として用いる場合、該リポソームは医薬効果を有する化合物を含んでいる必要がある。該医薬効果を有する化合物は、リポソーム中に封入させるか、あるいはリポソーム表面に結合させればよい。

#### 【0038】

糖鎖をリンカー蛋白質を介してリポソームへ結合させるには以下に述べる方法で行えばよい。

#### 【0039】

まずリポソーム表面に蛋白質を結合させる。リポソームを、 $\text{NaIO}_4$ 、 $\text{Pb(O}_2\text{CC H}_3)_4$ 、 $\text{NaBiO}_3$ 等の酸化剤で処理して、リポソーム膜面に存在するガングリオシドを酸化し、次いで、 $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 、 $\text{NaBH}_4$ 等の試薬を用いて、リンカー蛋白質とリポソーム膜面上のガングリオシドを、還元的アミノ化反応により結合させる。このリンカー蛋白質も、親水性化するのが好ましく、これにはリンカー蛋白質にヒドロキシ基を有する化合物を結合させるが、例えば、ビススルフォスクシニミデルスペラート、ジスクシニミデルグルタレート、ジチオビススクシニミデルプロピオネート、ジスクシニミデルスペラート、3,3'-ジチオビススルフォスクシニミデルプロピオネート、エチレンギリコールビススクシニミデルスクシネット、エチレンギリコールビススルフォスクシニミデルスクシネット等の2価試薬を用いて、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンをリポソーム上のリンカー蛋白質と結合させればよい。

#### 【0040】

これを具体的に述べると、まず、リンカー蛋白質の全てのアミノ基に架橋用2価試薬の一端を結合する。そして、各種糖鎖の還元末端をグリコシルアミノ化反応して得られる糖鎖グリコシルアミン化合物を調製し、この糖鎖のアミノ基とリポソーム上の上記で結合された架橋2価試薬の一部分の他の未反応末端とを結合する。

#### 【0041】

次に、このようにして得られる糖鎖結合リポソーム膜面上蛋白質の表面に糖鎖が結合していない未反応で残っている大部分の2価試薬未反応末端を用いて親水性化処理を行う。つまり、このリポソーム上蛋白質に結合している2価試薬の未反応末端とトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等の上述の親水性化に用いる化合物との結合反応を行い、リポソーム表面全体を親水性化する。

#### 【0042】

リポソーム表面およびリンカー蛋白質の親水性化は、各種組織への移行性、および血中における滞留性および各種組織への移行性を向上させる。これは、リポソーム表面およびリンカー蛋白質表面が親水性化されることによって、糖鎖以外の部分が、各組織等においてはあたかも生体内水分であるかのようにみえ、これにより、標的以外の組織等に認識されず、糖鎖のみがその標的組織のレクチン（糖鎖認識蛋白質）により認識されることに起因するものと思われる。

#### 【0043】

次いで、糖鎖をリポソーム上のリンカー蛋白質に結合させる。これには、糖鎖を構成する糖類の還元末端を、 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、 $\text{NH}_2\text{COONH}_4$ 等のアンモニウム塩を用いてグリコシルアミノ化し、次いで、ビススルフォスクシニミデルスペラート、ジスクシニミデルグルタレート、ジチオビススクシニミデルプロピオネート、ジスクシニミデルスペラート、3,3'-ジチオビススルフォスクシニミデルプロピオネート、エチレンギリコールビスス

クシニミヂルスクシネット、エチレングリコールビススルフォスクシニミヂルスクシネット等の2価試薬を用いて、リポソーム膜面上に結合したリンカー蛋白質と、上記グリコシルアミノ化された糖類とを結合させ、図1～22に示されるようなリポソームを得る。なお、これらの糖鎖は市販されている。

#### 【0044】

本発明のリポソームの粒径は、30～500nm、好ましくは50～300nm、さらに好ましくは70～150nmである。また、ゼータ電位は、-50～10mV、好ましくは-40～0mV、さらに好ましくは-30～-10mVである。本発明の医薬組成物に含まれるリポソーム製造の過程において、表面に何も結合していないリポソーム、親水性化されておらず糖鎖が結合したリポソーム、糖鎖が結合しておらず親水性化されたリポソームおよび親水性化され糖鎖が結合したリポソームの4つの態様のリポソームが存在し得るが、これらの4つの態様のリポソームが生理食塩水などの等張液において前記粒径の範囲およびゼータ電位の範囲に包含される。

#### 【0045】

さらに、糖鎖を結合させた場合の糖鎖の結合密度は、リポソームに結合させるリンカー蛋白質1分子当たり1～60個、好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個である。また、リポソーム1粒子当たりは、リンカー蛋白質を用いる場合は、1～30000個、好ましくは1～20000個、さらに好ましくは1～10000個、あるいは100～30000個、好ましくは100～20000個、さらに好ましくは100～10000個、あるいは500～30000個、好ましくは500～20000個、さらに好ましくは500～10000個である。リンカー蛋白質を用いない場合は、リポソーム1粒子当たり最高1～500000個、好ましくは1～300000個、さらに好ましくは1～100000個以上の糖鎖を結合させることができる。

#### 【0046】

##### (2) 本発明の標的指向性リポソームを含む眼病治療用組成物

本発明は、上記シリルルイスX型糖鎖またはこれと同様にE-セレクチン、P-セレクチン等に反応することができる糖鎖を糖鎖の種類および密度を制御して表面に結合した標的指向性リポソームを含む眼病治療用または診断用医薬組成物を包含する。

#### 【0047】

本発明の、眼病治療用または診断用医薬組成物が対象とする眼病は、限定されないが、ぶどう膜炎を含む内眼炎、糖尿病網膜症、血管新生黄斑症、アレルギー性結膜炎、眼窩および眼内腫瘍、視神経炎、強膜炎（後部強膜炎を含む）等が挙げられる。

#### 【0048】

本発明の眼病治療用または診断用医薬組成物が含む標的指向性リポソームは、眼病治療用の医薬効果を有する化合物を含み、それらの化合物は限定されないが、副腎皮質ホルモン、抗炎症薬、免疫抑制剤、抗がん剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNAやDNAなどの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子等が挙げられる。

#### 【0049】

これらの、化合物は、リポソーム中に封入されていても、リポソーム表面に結合しているよいが、リポソーム中に封入されているのが望ましい。これらの化合物は、その化合物が有する官能基を利用することにより、公知の方法で、結合させることができる。

#### 【0050】

リポソーム内部への封入は、以下の方法により行う。リポソームへ薬剤等を封入するには、周知の方法を用いればよく、例えば、薬剤等の含有溶液とフォスファチジルコリン類、フォスファチジルエタノールアミン類、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリシン酸塩類、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類およびコレステロール類を含む脂質を用いてリポソームを形成することにより、薬剤等はリポソーム内に封入される。

#### 【0051】

本発明の医薬組成物は、シリルルイスX型糖鎖またはこれと同様にE-セレクチン、P-

セレクチン等に反応することができる糖鎖を糖鎖の種類および密度を制御して表面に結合した標的指向性リポソームの他に薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤等を含んでいてもよい。本発明の医薬組成物は、種々の形態で投与することができる。このような投与形態としては、点眼剤等による点眼投与、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、あるいは注射剤、点滴剤、座薬などによる非経口投与を挙げることができる。かかる組成物は、公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤、賦形剤を含む。たとえば、錠剤用の担体、賦形剤としては、ゲル化剤、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。注射剤は、本発明の糖鎖結合リポソームを通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール、プロピレン glycolなどのポリアルコール、非イオン界面活性剤などと併用しても良い。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用しても良い。

#### 【0052】

本発明の医薬組成物の投与経路は、限定されず、点眼、経口投与、静脈注射、筋肉注射等がある。投与量は、眼病の重篤度等により適宜決定できるが、本発明の組成物の医薬的に有効量を患者に投与する。ここで、「医薬的に有効量を投与する」とは、眼病を治療するのに適切なレベルの薬剤を患者に投与することをいう。本発明の医薬組成物の投与回数は適宜患者の症状に応じて選択される。

#### 【0053】

また、本発明の医薬組成物を診断用に用いる場合は、リポソームに蛍光色素、放射性化合物等の標識化合物を結合させる。該標識化合物結合リポソームが患部に結合し、標識化合物が患部細胞に取り込まれ、該標識化合物の存在を指標に疾患を検出・診断することができる。

#### 【0054】

さらに、本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0055】

##### リポソームの調製

リポソームは既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) Methods Enzymol. 242, 56-65) により、改良型コール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルフォスフェート、ガングリオシド及びジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンをモル比でそれぞれ35:40:5:15:5の割合の合計脂質量45.6mgにコール酸ナトリウムを46.9mg添加し、クロロホルム/メタノール溶液3mlに溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜をTAPS緩衝液(pH 8.4) 3mlに懸濁、超音波処理して、透明なミセル懸濁液を得た。さらに、ミセル懸濁液をPM10膜 (Amicon Co., USA) とPBS緩衝液(pH 7.2) を用いた限外濾過にかけ均一リポソーム (平均粒径100nm) 10mlを調製した。

#### 【実施例2】

#### 【0056】

##### リポソーム脂質膜面上の親水性化処理

実施例1で調製したリポソーム溶液10mlをXM300膜 (Amicon Co., USA) とCBS緩衝液(pH 8.5) を用いた限外濾過にかけ溶液のpHを8.5にした。次に、架橋試薬bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS<sup>3</sup>; Pierce Co., USA) 10mlを加え、25℃で2時間攪拌した。その後、更に7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンとBS<sup>3</sup>との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液をXM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5) で限外濾過にかけた。次に、CBS緩衝液(pH 8.5) 1mlに溶かしたtris(hydroxymethyl

1) aminomethane 40mgをリポソーム液10mlに加えて、25℃で2時間攪拌後、7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質に結合したBS<sup>3</sup>とtris(hydroxymethyl)aminomethaneとの化学結合反応を完結した。これにより、リポソーム膜の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン上にtris(hydroxymethyl)aminomethaneの水酸基が配位して水和親水性化された。

### 【実施例3】

#### 【0057】

##### リポソーム膜面上へのヒト血清アルブミン (HSA) の結合

既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) Methods Enzymol. 242, 56-65) により、カップリング反応法を用いて行った。すなわち、この反応は2段階化学反応で行い、まずはじめに、実施例2で得られた10mlのリポソーム膜面上に存在するガングリオシドを1mlのTAPS緩衝液(pH 8.4)に溶かしたメタ過ヨウ素酸ナトリウム43mgを加えて室温で2時間攪拌して過ヨウ素酸酸化した後、XM300膜とPBS緩衝液(pH 8.0)で限外濾過することにより酸化されたりポソーム10mlを得た。このリポソーム液に、20mgのヒト血清アルブミン(HSA)を加えて25℃で2時間攪拌し、次にPBS(pH 8.0)に2M NaBH<sub>3</sub>CN 100 μlを加えて10℃で一晩攪拌してリポソーム上のガングリオシドとHSAとのカップリング反応でHSAを結合した。そして、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過をした後、HSA結合リポソーム液10mlを得た。

### 【実施例4】

#### 【0058】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのルイスX型三糖鎖、シアリルルイスX型四糖鎖、3' -シアリルラクトサミン三糖鎖、6' -シアリルラクトサミン三糖鎖、アルファ1,2マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3マンノビオース二糖鎖、アルファ1,4マンノビオース二糖鎖、アルファ1,6マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース3五糖鎖、オリゴマンノース4 b六糖鎖、オリゴマンノース5七糖鎖、オリゴマンノース6八糖鎖、オリゴマンノース7九糖鎖、オリゴマンノース8十糖鎖またはオリゴマンノース9十一糖鎖の結合

ルイスX型三糖鎖(Calbiochem Co., USA) 50 μgを0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μmのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してルイスX型三糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μgを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3' -dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のルイスX型三糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μgを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにルイスX型三糖鎖の結合を行った。その結果、図1で示されるルイスX型三糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム 2ml (総脂質量2mg、総蛋白量200 μg、平均粒径100nm) が得られた。他の糖鎖結合リポソームも用いる糖鎖を変えて同様の方法で作製した。これらの糖鎖結合リポソームは、図2から16に示した。

### 【実施例5】

#### 【0059】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのラクトース二糖鎖、2' -フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖類、3-フコシルラクトース三糖鎖、3' -シアリルラクトース三糖鎖、6' -シアリルラクトース三糖鎖3' -シアリルラクトサミン三糖鎖または6' -シアリルラクトサミン三糖鎖の結合 (糖鎖結合量が異なるもの3種類)

ラクトース二糖鎖 (Wako Pure Chemical Co., Japan) (1)50 μg、又は、(2)200 μg、又は、(3)1mg) を0.25gのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μmのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してラクトース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μgを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1

mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のラクトース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50μgを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにラクトース二糖鎖の結合を行った。その結果、糖鎖結合量が異なるもの3種類の図17で示されるラクトース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム各2ml（総脂質量2mg、総蛋白量200μg、平均粒径100nm）が得られた。他の糖鎖結合リポソームも用いる糖鎖を変えて同様の方法で作製した。他の糖鎖結合リポソームの構造を図3、4および18～22に示す。

#### 【実施例6】

##### 【0060】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのtris(hydroxymethyl)aminomethaneの結合

比較試料としてのリポソームを調製するために、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液にtris(hydroxymethyl)aminomethane(Wako Co., Japan) 13mgを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにtris(hydroxymethyl)aminomethaneの結合を行った。その結果、図25で示されるtris(hydroxymethyl)aminomethaneとヒト血清アルブミンとリポソームとが結合した比較試料としてのリポソーム 2ml（総脂質量2mg、総蛋白量200μg、平均粒径100nm）が得られた。

#### 【実施例7】

##### 【0061】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上の親水性化処理

実施例4または5の手段により調整されたリポソームについて、以下の手順によりリポソーム上のHSA 蛋白質表面の親水性化処理を行った。糖鎖結合リポソーム2mlに、tris(hydroxymethyl)aminomethane 13mgを加えて、25℃で2時間、その後7℃で一晩攪拌した後、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過し未反応物を除去して、最終産物である親水性化処理された糖鎖結合リポソーム複合体各2ml（総脂質量2mg、総蛋白量200μg、平均粒径100nm）を得た。

#### 【実施例8】

##### 【0062】

ぶどう膜炎モデルマウスの作成

実験的ぶどう膜炎 (Experimental Autoimmune Uveoretinitis: 以下EAU) モデルマウスの作出には、以下の材料を用いた。

実験動物：C57BL/6マウス（雌、8週齢）

接種抗原：ヒト網膜特異的蛋白IRBP (Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein)

合成ペプチド 配列 GPTHLFQPSLVLDMAKVLLD (1-20)

アジュバント：結核(H37RA)死菌 6 mg/ml 含有complete Freund's adjuvant (CFA)

増幅効果剤：百日咳毒素(Purified Bordetella pertussis toxin (PTX))

##### 【0063】

ペプチド水溶液とアジュバントを容積比で1:1に混和し乳濁液として調製する。8週齢のC57BL/6雌マウスに1匹あたり、足背皮下50μg・鼠径部皮下50μg、合計200μg接種する。1匹あたり100ngの百日咳毒素を追加アジュバントとして腹腔内投与する。EAU発症の程度は、0.5%トロピカミド・0.5%塩酸フェニレフリンにより瞳孔を散大させ眼底観察することにより評価した。

## 【0064】

結果は図24に提示する。EAUは投与16日目をピークに発症した。

ペプチド投与後16日目において炎症細胞が脈絡膜、網膜、硝子体腔に浸潤しているのが観察できる。

本方法でヒトの内眼炎モデルであるEAUが作成されていることが確認された。

## 【実施例9】

## 【0065】

## リポソームの生体内動態検討

投与リポソームは、上記実施例で作製した糖鎖結合リポソームのうち、シアリルルイスX糖鎖結合リポソーム（以下糖鎖+リポソーム）および糖鎖の結合していないリポソーム（以下糖鎖-リポソーム）であった。

## 【0066】

EAUマウスおよび正常マウスに対し、糖鎖+リポソーム、糖鎖-リポソームをそれぞれ投与し、マウスの各臓器へのリポソームの集積を評価することを目的として行った。

## 【0067】

ペプチド投与16日目にEAU発症を確認したEAUマウスおよび正常マウスを用意する。あらかじめ $50\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製したリポソーム溶液をマウスの尾静脈より静注し、静注後ヘパリン生食で脱血還流の後、全各臓器を摘出した。各臓器は1%TritonX溶液とHG30ホモゲナイザー（日立工機）を用いて組織ホモジネートとして調製の後、100%メタノールとクロロホルムを用いて組織ホモジネートに含まれるリポソームを抽出した。リポソーム量は、リポソームに結合したFITCの蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダーBiolumin 960（モレキュラーダイナミック社）を用いて行い、490nmのexcitationと520nmのemissionで計測した。

## 【0068】

リポソーム投与後、眼において集積の時間経過を調べた。その結果30分をピークにして集積することが明らかとなった。従って、各臓器での集積検討はリポソーム投与30分後に時間設定して行った。結果は図25に提示する。まず、正常マウスでは各臓器において糖鎖+リポソームと糖鎖-リポソームの集積に差は認めない。一方、EAUマウスの眼では糖鎖+リポソームは正常マウスの眼の6倍の集積を認めた。しかし糖鎖-リポソームではEAUマウスの眼への集積は正常マウスに比較し1.5倍にとどまっている。EAUマウスの眼以外の臓器においては糖鎖+リポソームと糖鎖-リポソームの集積に著明な差は認めず、その値は正常マウスのそれと比較してもほぼ同程度であった。

## 【0069】

炎症を起こした眼でのみリポソームの取り込みの増加を認めた。糖鎖-リポソームがEAUマウスの眼で正常マウスの眼の1.5倍の取り込みを認めたのは血管内皮細胞間隙の拡大によるものと考えられる（passive transport）。一方、糖鎖+リポソームがEAUマウスの眼で正常マウスの眼の6倍の集積（すなわち糖鎖-リポソームと比較して約4倍の集積）を認めたことは炎症部位に発現したE-セレクチン、P-セレクチンを標的としたためと考えられる（active transport）。

## 【実施例10】

## 【0070】

## リポソームの炎症部位への集積

炎症臓器（眼）のどの部位にリポソームの集積が生じるかを評価することを目的として行った。

## 【0071】

ペプチド免疫後16日目のEAU発症マウスの尾静脈よりリポソームを投与。30分後にマウス眼球を摘出しそのままOCTコンパウンドに包埋・凍結した。クライオトームを用いて6~8μm凍結切片を作製しAxioVision（カールツァイス社）を用いて観察した。

## 【0072】

結果は図26に提示する。EAUマウスに糖鎖+リポソームを投与すると、投与後5分において強膜に集積が認められ、7分において脈絡膜の脈絡膜毛細管板に当たる部位に細い1筋

の集積が認められる。投与後10分ではその集積ラインが拡大しているのが観察できる。30分では、集積ラインは薄まり、周囲の組織への蛍光物質の拡散が観察できる（図26）。一方、糖鎖+リポソームでは集積ラインの形成は認められず、30分においても明らかな蛍光物質の貯留、拡散は観察できない（図26-F）。また、正常マウスにおいてはいずれのリポソームにおいても蛍光物質は確認できない（図27）。

#### 【0073】

血管の最も豊富な脈絡膜毛細管板から糖鎖+リポソームの集積が開始され、時間とともに周囲の組織に拡散していくというリポソームの炎症部位での動態があきらかとなった。これは糖鎖+リポソームが炎症部位の血管に発現しているE-セレクチン、P-セレクチンを標的として集積し、その後、炎症により拡大した血管内皮細胞間隙を通って周囲組織に拡散していったものと考えることができる。一方、糖鎖+リポソームで明確な蛍光色素が観察できなかつたのは、このリポソームの炎症部位への集積がpassive transportであるため、糖鎖+リポソームのように標的となって集積する部位がなく、個々ばらばらに組織に拡散していくためと考えられる。

#### 【実施例11】

#### 【0074】

##### E-セレクチン、P-セレクチンの発現

E-セレクチン、P-セレクチンがEAUマウス眼において確かに発現しているのか、そしてその発現部位が糖鎖+リポソームが最初に集積した集積ラインと一致しているかを確認することを目的として行った。

#### 【0075】

EAU発症マウス、正常マウスを準備する。眼球摘出後4%グルタルアルデヒドで固定し30%シュクロースPBSで脱水した眼球をOCTコンパウンドに包埋・凍結する。

#### 【0076】

(1) 蛍光抗体法による検出：14から16μmの凍結切片を用いて、プロッキングの後、抗マウスE-selectin 1次抗体（ポリクローナル抗体：ヤギ）を反応させる。FITC結合の抗ヤギIgG二次抗体によりシグナルを検出した。

#### 【0077】

(2) 酵素抗体法による検出：抗マウスE-selectin およびP-selectin 1次抗体（ポリクローナル抗体：ヤギ）による反応は蛍光抗体法と同様に行い、二次抗体反応は、VECTASTAIN（登録商標）ABC-AP kitおよびVector（登録商標）Red Alkaline Phosphatase Substrate kit Iを用いて行った。

#### 【0078】

どちらの検出方法においても、免疫染色の特異性を確認するために、抗体を購入した会社からそれぞれの抗体作成に使用したペプチドを購入し、プロッキングペプチドとして用い染色が消失するかいなかを確認した。

#### 【0079】

結果は図28および29に提示する。E-セレクチン、P-セレクチンとともに糖鎖+リポソームの集積ラインに一致した部位で強く発現していることが観察できた。また、使用した抗体に対する中和ペプチドにより染色が消失したことはこの免疫染色の特異性を示すものと考えられた。一方、正常マウスではE-セレクチン、P-セレクチンともに発現を認めなかった。

#### 【0080】

EAUマウスにおけるE-セレクチン、P-セレクチンの発現部位と糖鎖+リポソームの集積部位が一致したことは、このリポソームの標的がE-セレクチン、P-セレクチンであるという理論を支持するものである。

#### 【実施例12】

#### 【0081】

##### E-セレクチンとP-セレクチンの抗体投与による糖鎖+リポソームの集積阻害

糖鎖+リポソームの標的分子が確かにE-セレクチンとP-セレクチンであることを示すこ

とを目的として行った。

【0082】

EAU発症マウスの尾静脈より抗マウスE-selectin抗体200 $\mu$ g、抗マウスP-selectin抗体200 $\mu$ gを同時投与し4時間待ち、受容体を中和する。コントロールとして、EAU発症マウスの尾静脈より400 $\mu$ gのアイソタイプIgGを投与したもの用意する。投与4時間後、糖鎖+リポソームを尾静脈より投与し10分後眼球摘出し凍結標本を作製する。6~8 $\mu$ mの凍結切片を作製しAxioVisionを用いて、リガンド-受容体特異的結合が阻害されるか解析する。

【0083】

結果を図30に提示する。E-セレクチンとP-セレクチンの抗体を同時にEAUマウスに投与することで糖鎖+リポソームの集積を阻害することができた。アイソタイプIgGの投与では集積を阻害することはできなかった。また、E-セレクチンとP-セレクチンのそれぞれの抗体単独投与では完全には集積を阻害することはできなかった。

【0084】

この結果と、実施例11で示した結果を併せて考えると、糖鎖+リポソームの標的はE-セレクチンとP-セレクチンであると結論できる。

【0085】

以上の実験結果より、シアリルルイスX糖鎖結合リポソームはE-セレクチンとP-セレクチンを多く発現している病巣部位特異的に薬剤をデリバリーできることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0086】

本発明のシアリルルイスX糖鎖等の糖鎖を結合したリポソームは、眼炎症等の眼病の病変部位に特異的に到達し、該部位で医薬効果を有する薬剤を放出するので、眼病治療用または診断用製剤として利用可能である。

【図面の簡単な説明】

【0087】

【図1】ルイスX型三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図2】シアリルルイスX型四糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図3】3'-シアリルラクトサミン三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図4】6'-シアリルラクトサミン三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図5】アルファ1,2マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図6】アルファ1,3マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図7】アルファ1,4マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図8】アルファ1,6マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図9】アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図10】オリゴマンノース3五糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図11】オリゴマンノース4b六糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図12】オリゴマンノース5七糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図13】オリゴマンノース6八糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図14】オリゴマンノース7九糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図15】オリゴマンノース8十糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図16】オリゴマンノース9十一糖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図17】ラクトース二糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

【図18】2'-フコシルラクトース三糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

【図19】ジフコシルラクトース四糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

【図20】3-フコシルラクトース三糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

【図21】3'-シアリルラクトース三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図22】6'-シアリルラクトース三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図23】比較試料としてのtris(hydroxymethyl)aminomethaneを結合したリポソームの模式図である。

【図24】実験的ぶどう膜炎発症を示す図である。

【図25】リポソームの臓器別分布を示す図である。

【図26】リポソーム分布の時間経過を示す図である。

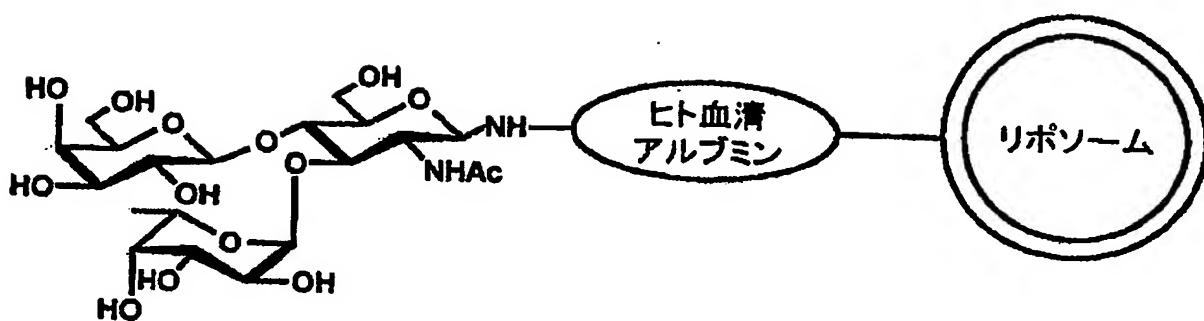
【図27】正常マウスおよびEAUマウスでのリポソーム分布を示す図である。

【図28】蛍光抗体法による検出の結果を示す図である。

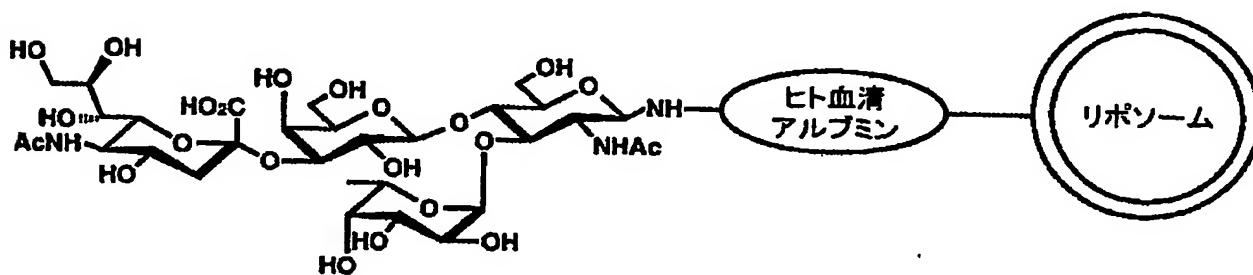
【図29】酵素抗体法による検出の結果を示す図である。

【図30】結合阻害実験の結果を示す図である。

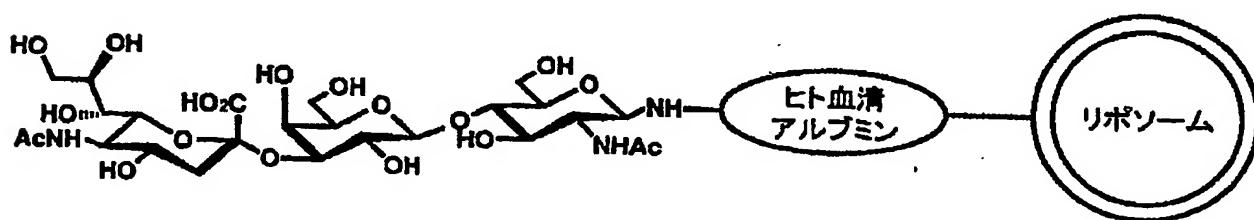
【書類名】図面  
【図 1】



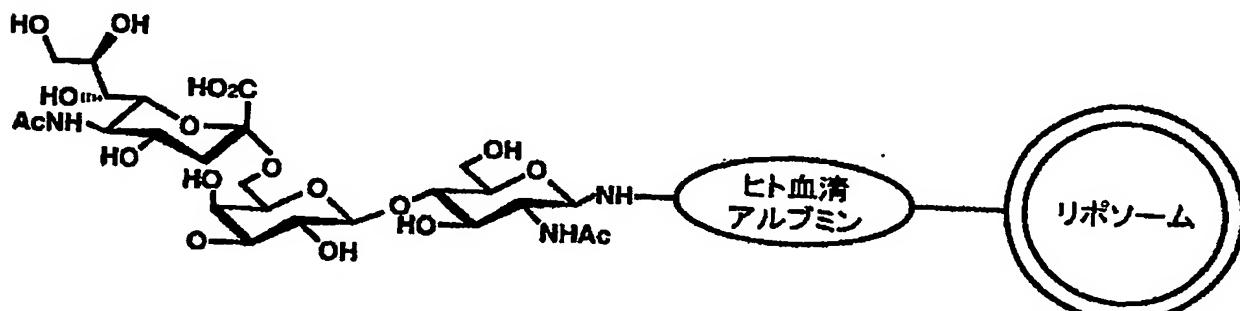
【図 2】



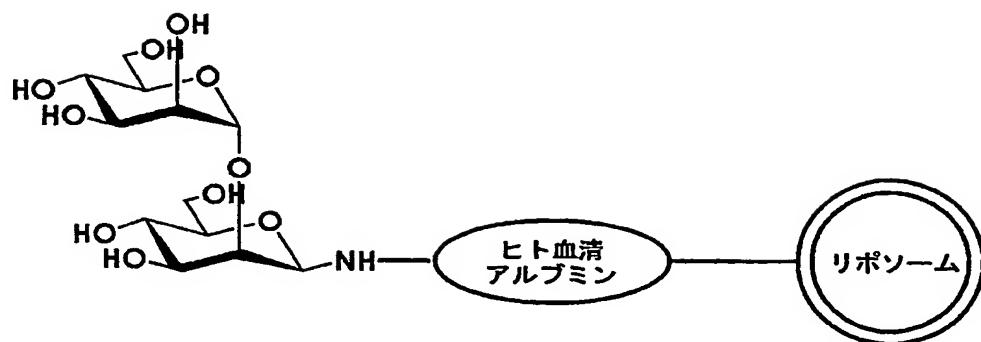
【図 3】



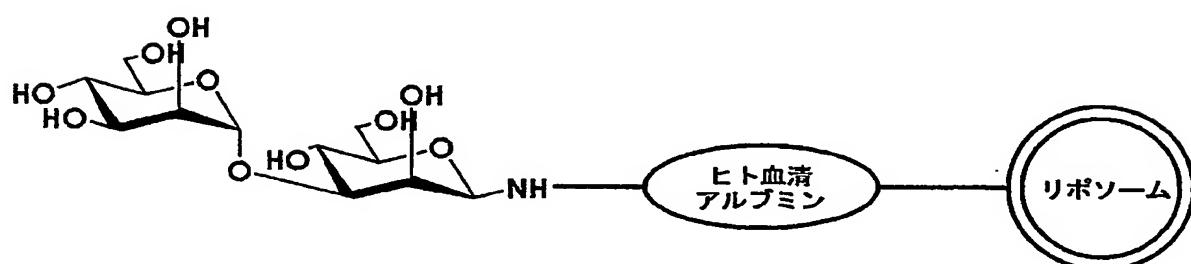
【図 4】



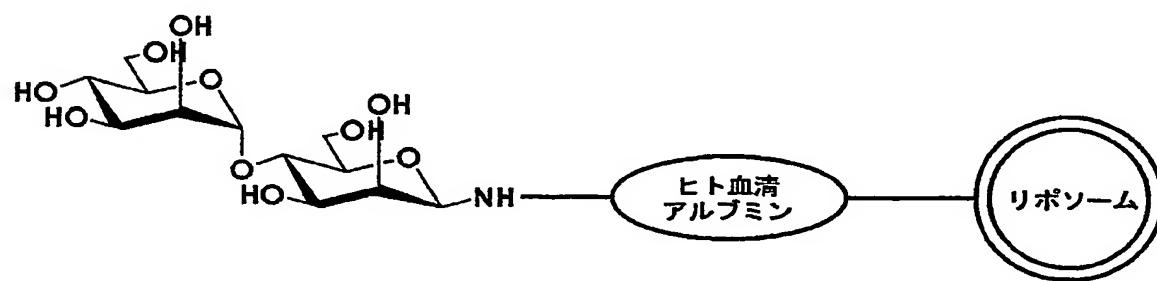
【図5】



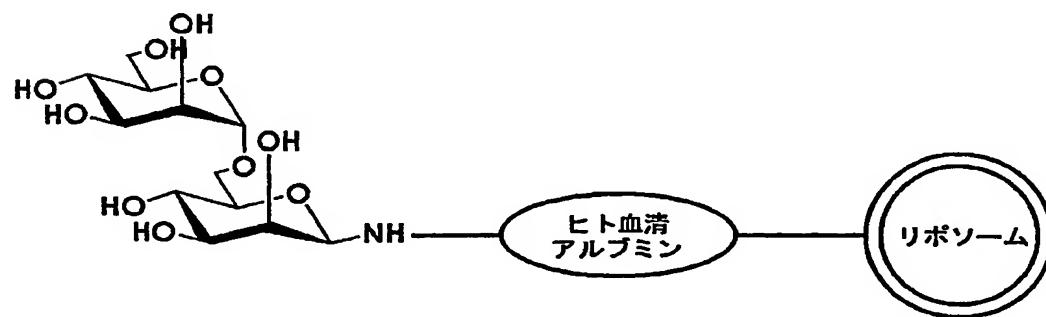
【図6】



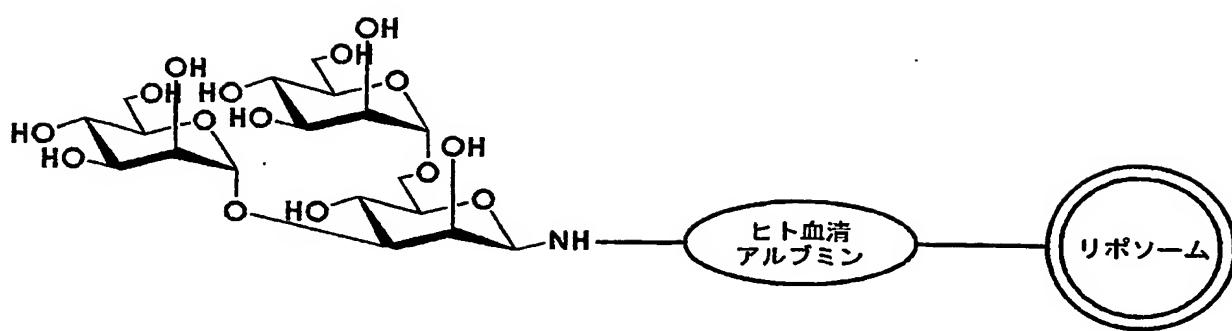
【図7】



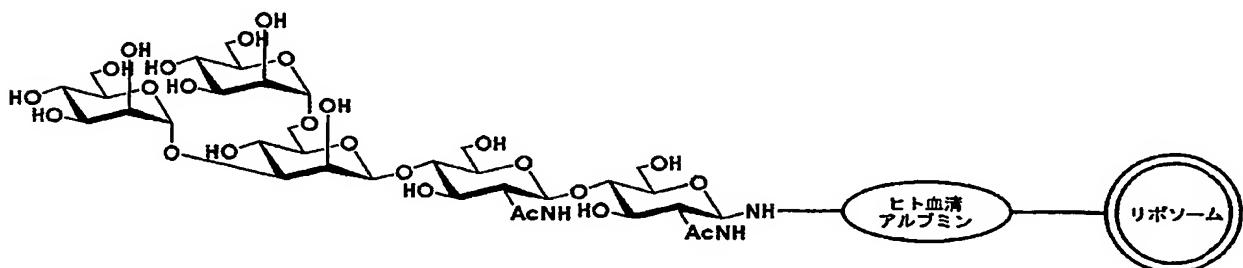
【図8】



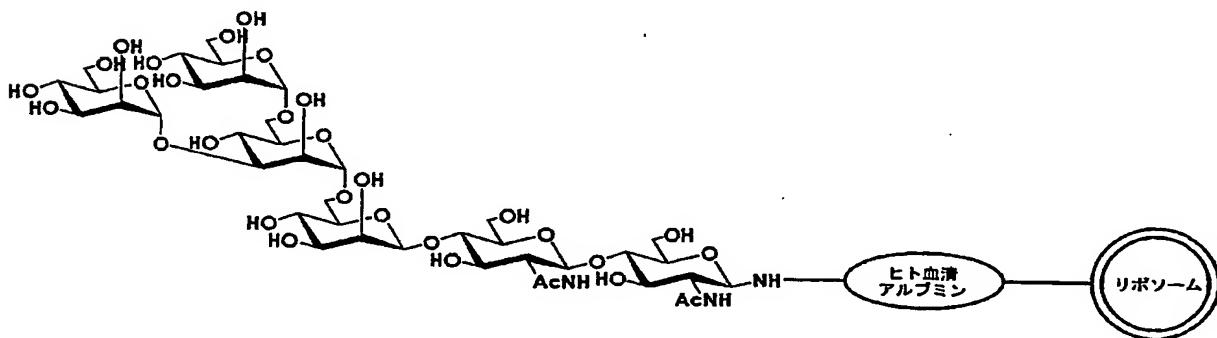
【図 9】



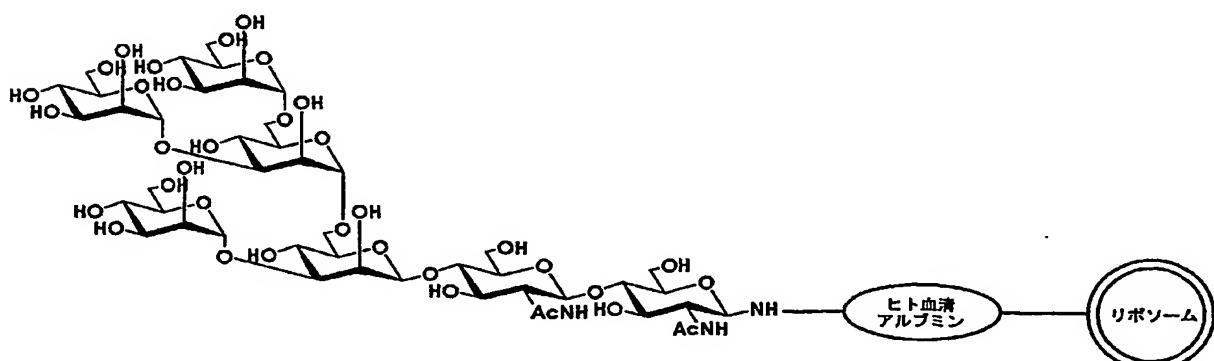
【図 10】



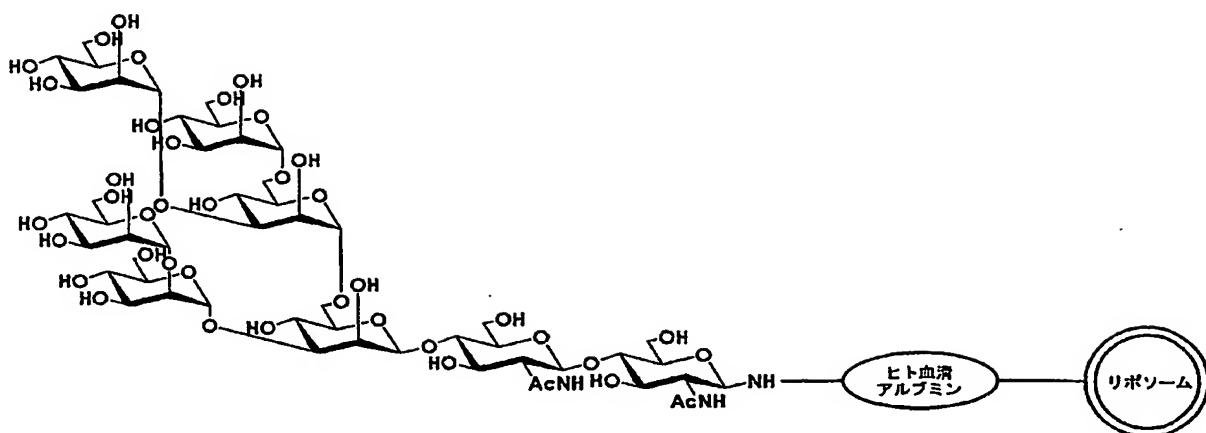
【図 11】



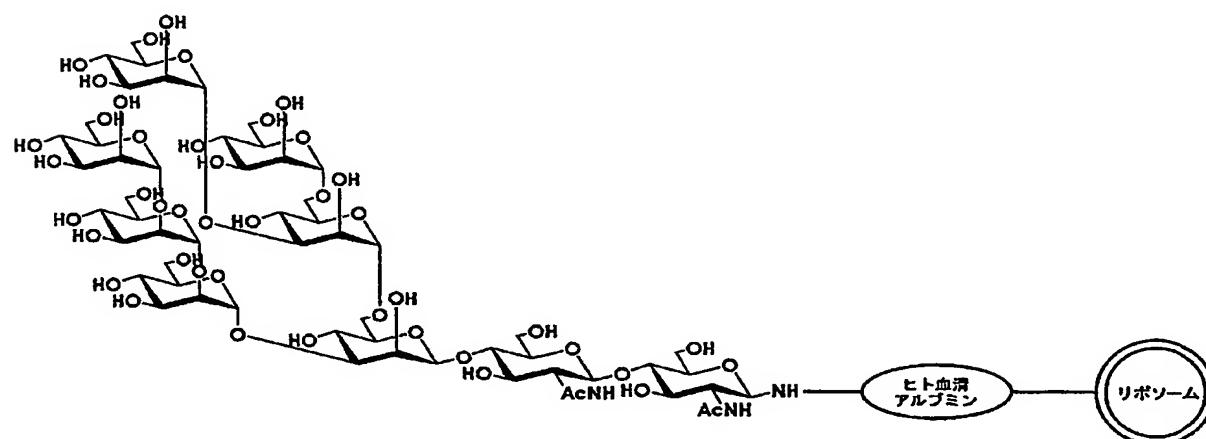
【図 12】



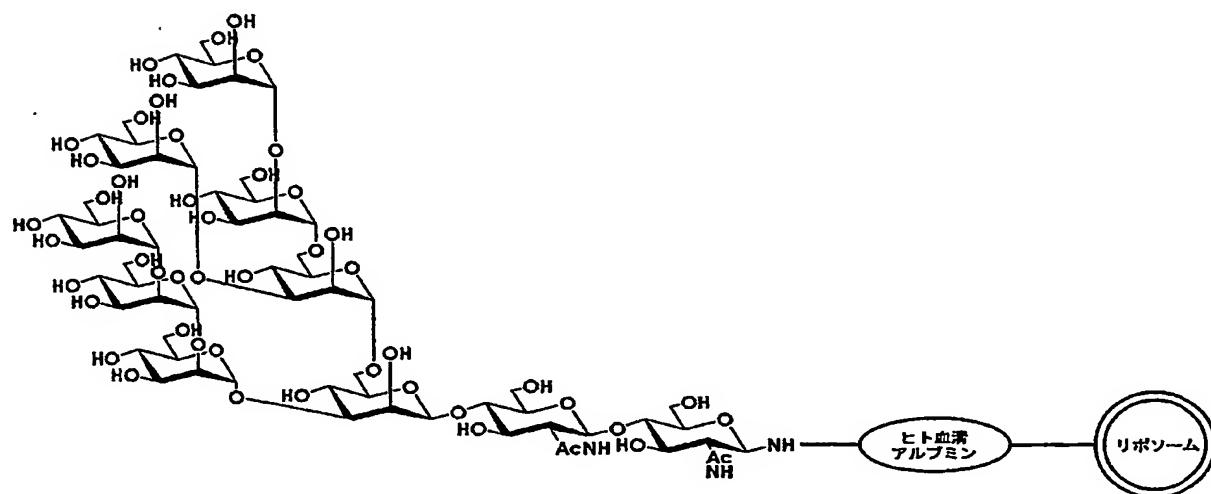
【図13】



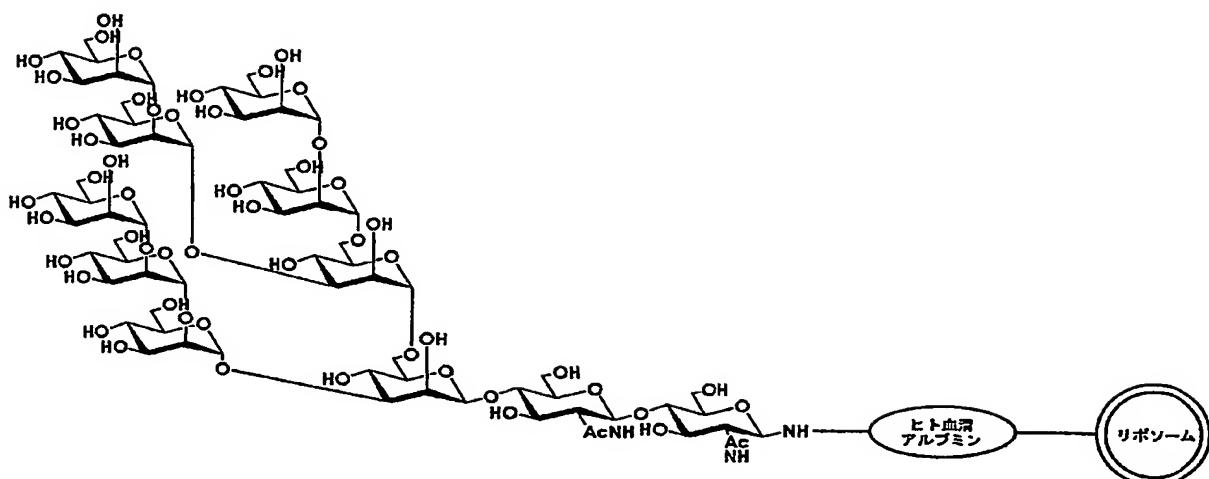
【図14】



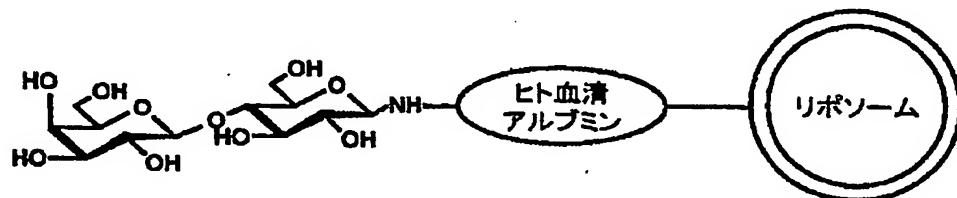
【図15】



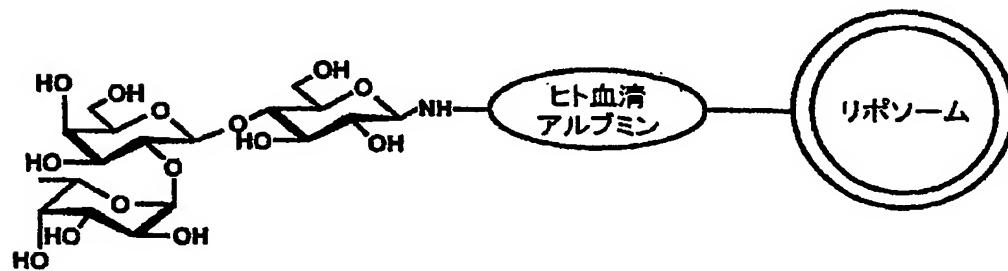
【図 16】



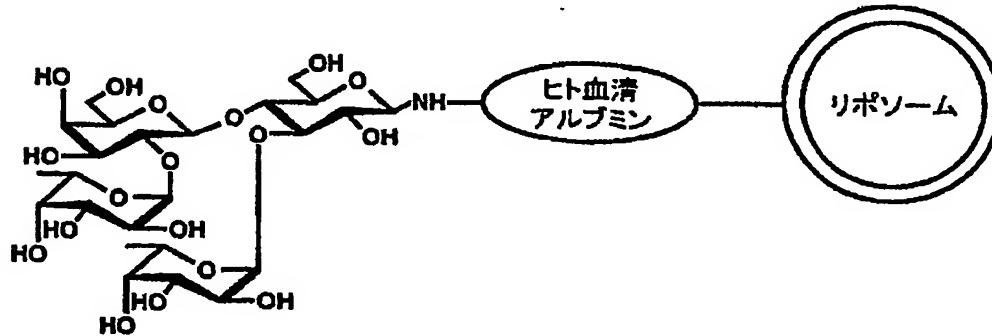
【図 17】



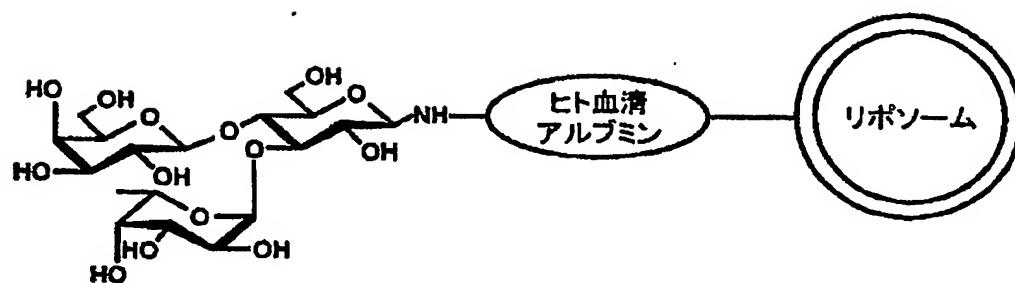
【図 18】



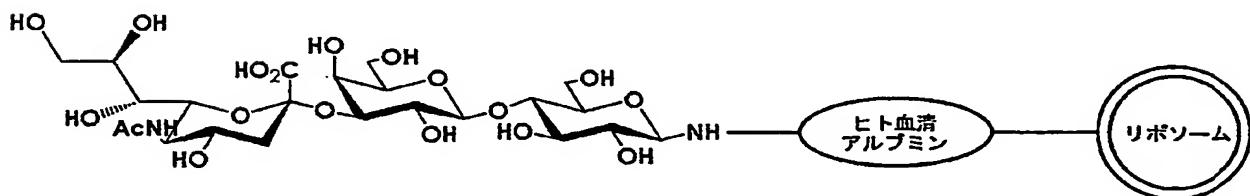
【図 19】



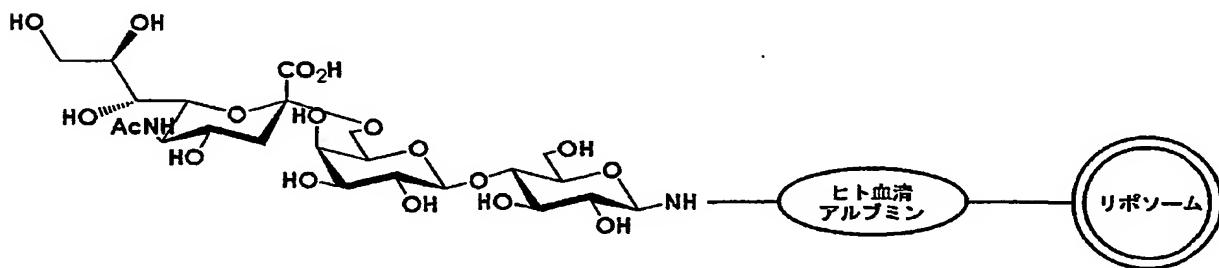
【図20】



【図21】



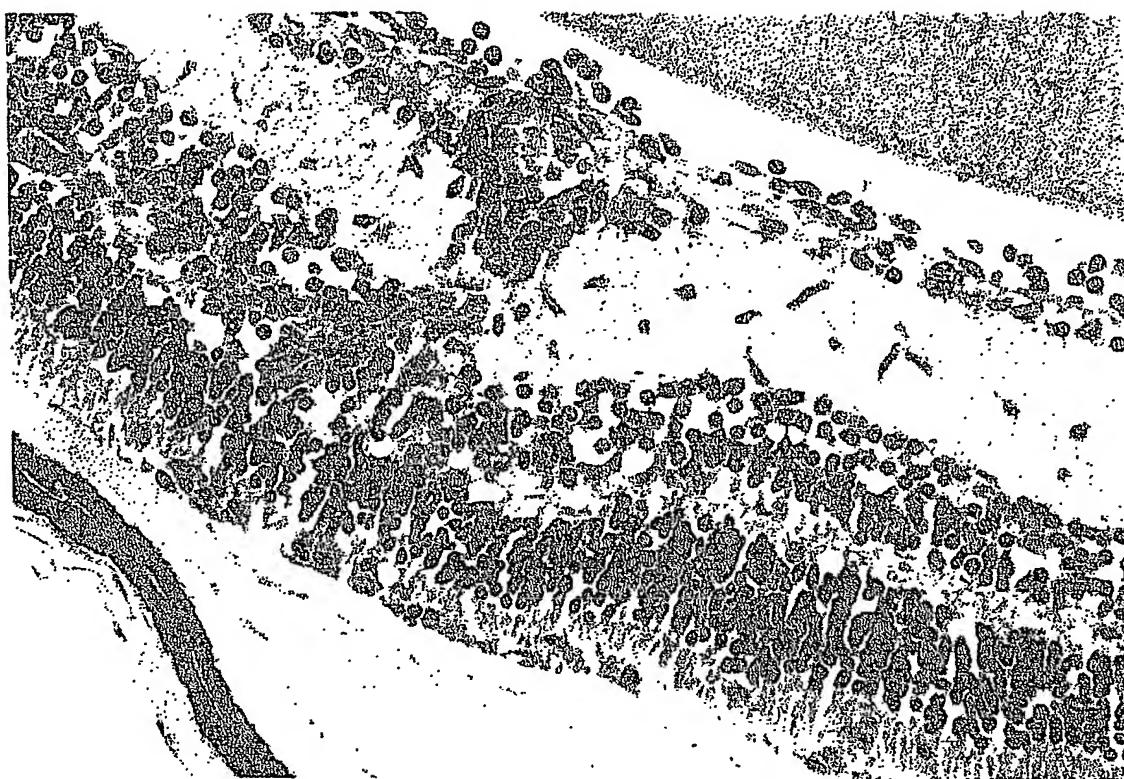
【図22】



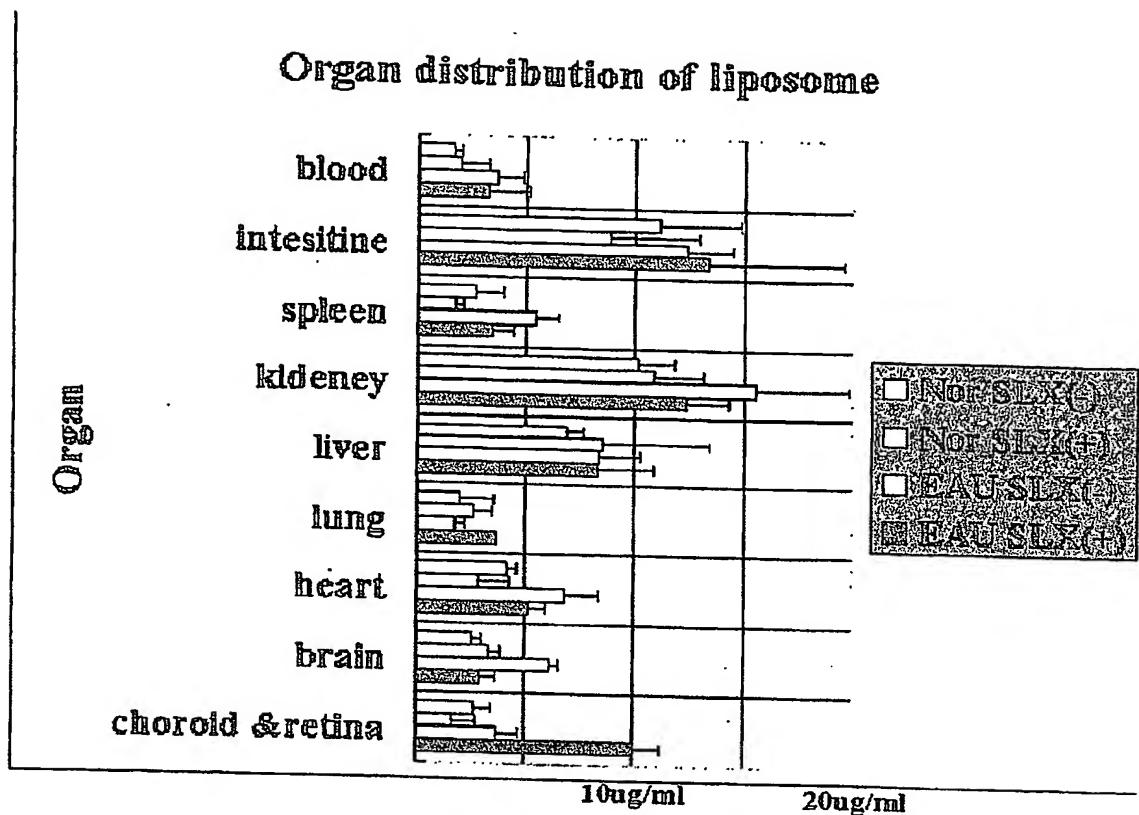
【図23】



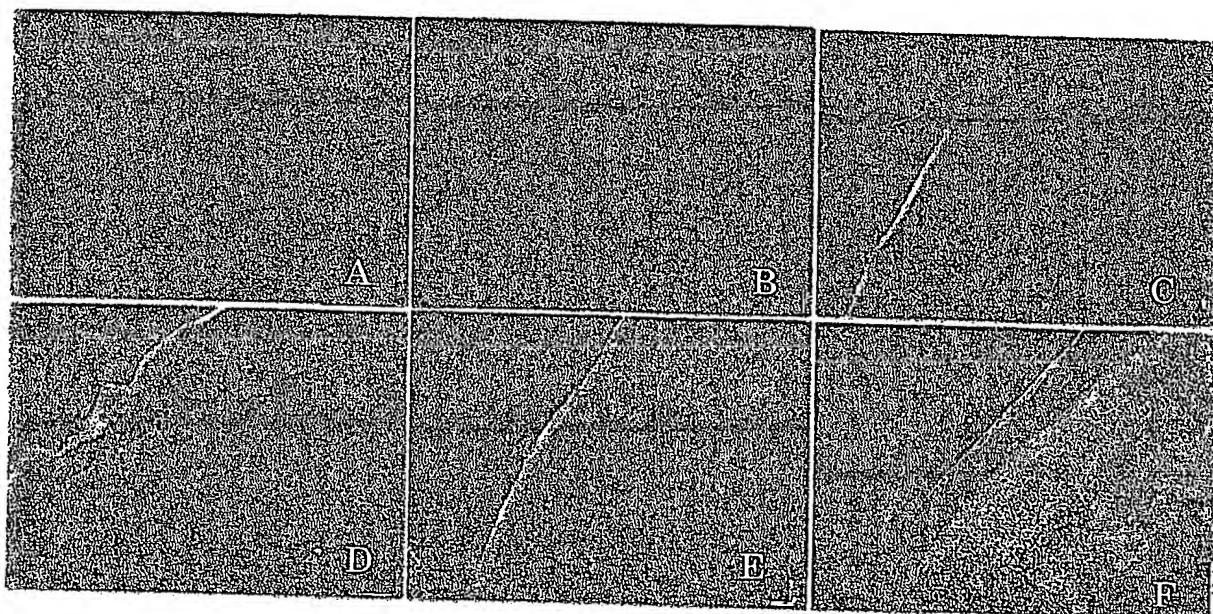
【図24】



【図 25】



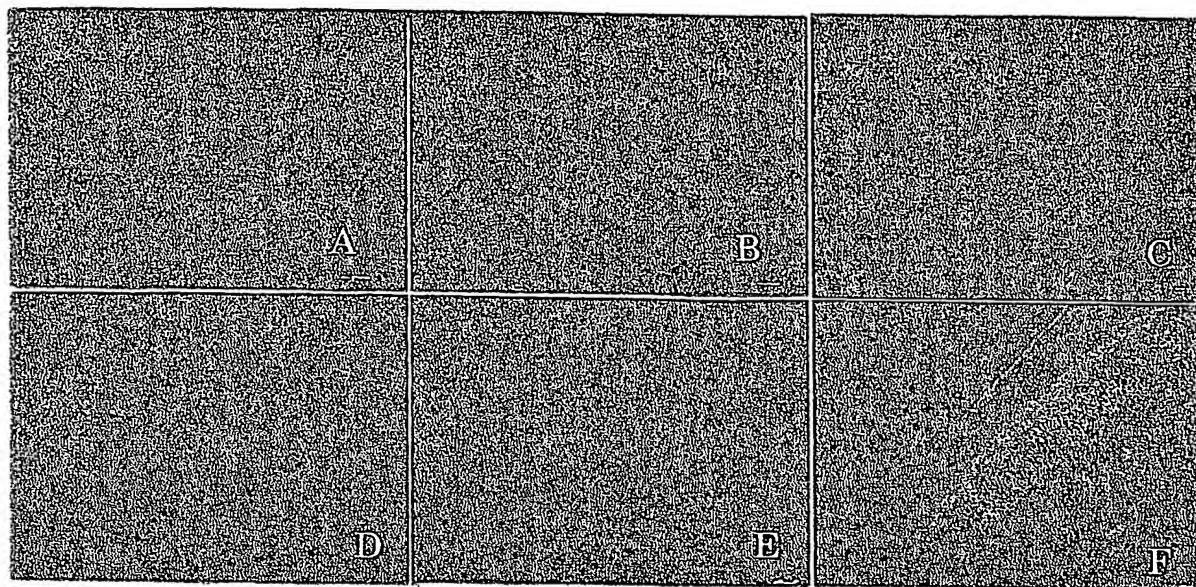
【図 26】



1min	3min	5min
7min	10min	30min

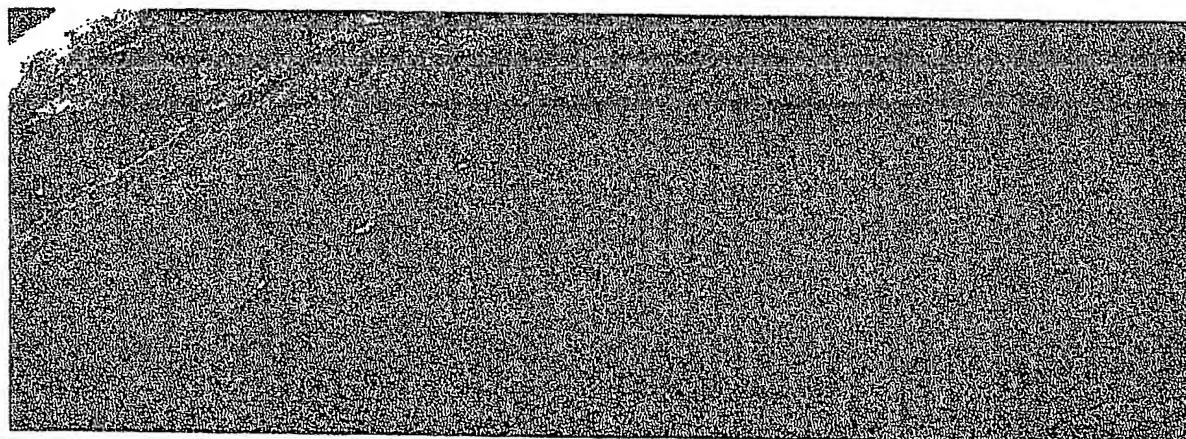
EAU マウスに糖鎖ありリポソーム投与

【図27】



Nor control	Nor SLX(-)	Nor SLX(+)
EAU control	EAU SLX(-)	EAU SLX(+) (faint band)

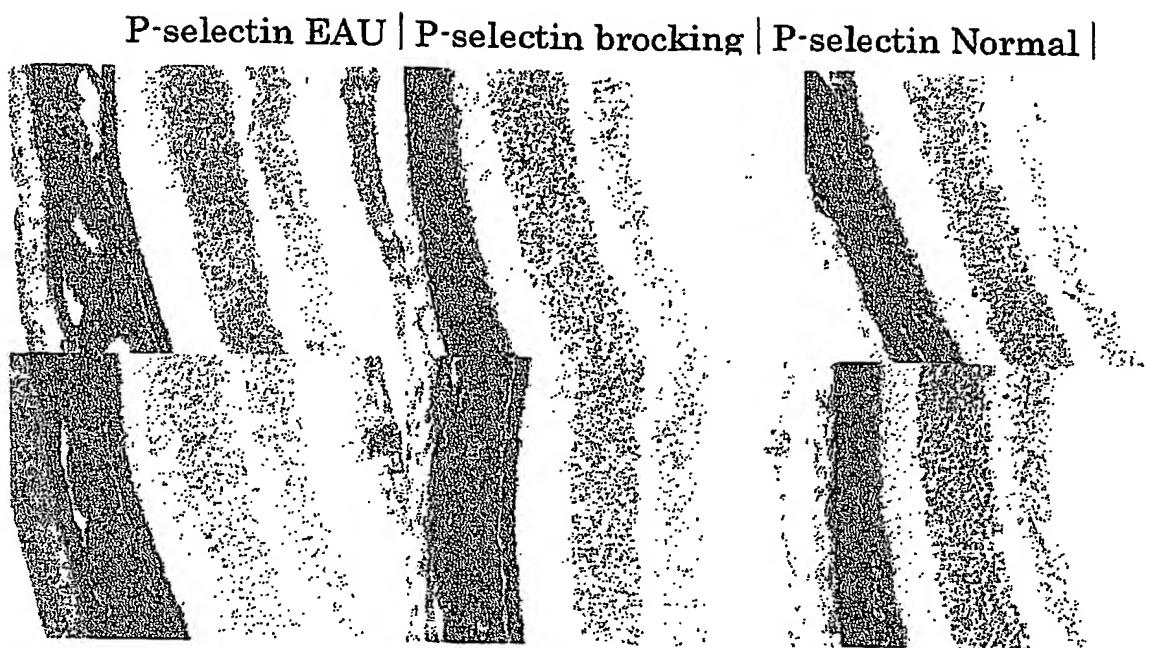
【図28】



抗E-selectin ポリクローナル抗体

ブロッキングペプチド

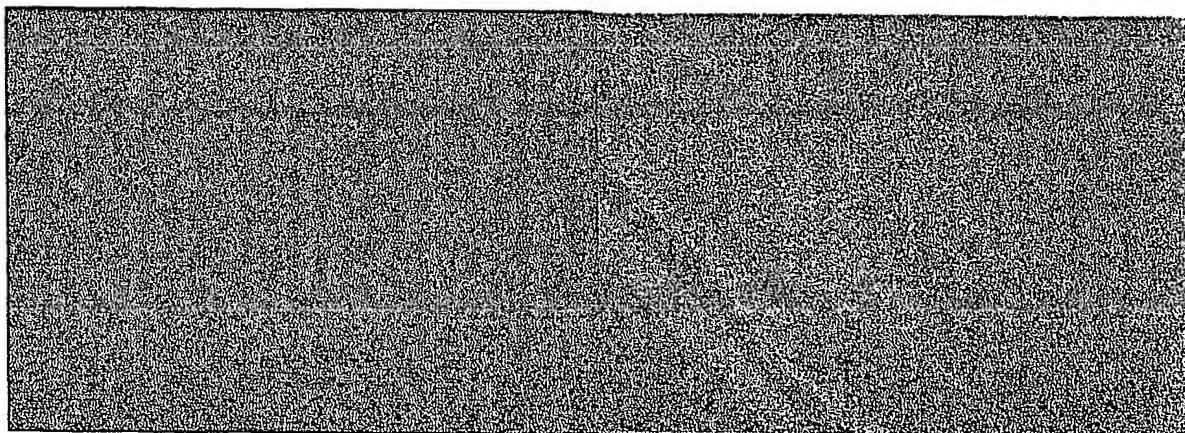
【図29】



【図30】

抗 P-selectin+E-selectin  
抗体投与群

アイソタイプ 1gG 投与群



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 眼炎症部位等の標的組織に集積し、局所的に薬剤や遺伝子を患部に送り込むための治療用または診断用のドラッグデリバリーシステム（DDS）として利用できる標的指向性DDSナノ粒子の提供。

【解決手段】 糖鎖がリポソーム膜に結合されている糖鎖修飾リポソームを含む眼病治療用または診断用医薬組成物。

【選択図】 なし

特願 2003-285422

出願人履歴情報

識別番号 [301021533]

1. 変更年月日 2001年 4月 2日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都千代田区霞が関 1-3-1  
氏名 独立行政法人産業技術総合研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

### **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**